

z sugestią [10,11], iż podczas cyklicznych odkształceń następuje destrukcja twardych domen i/lub wymieszanie segmentów sztywnych i giętkich. RYSUNEK 2 przedstawia porównanie kształtu pętli histerezy nr. 50 000 dla polimerów testowanych przy stałym, cyklicznym obciążeniu. Znacznie szersze pole pętli histerezy kopolimeru poliuretanowego w porównaniu do kopolimeru PED może wskazywać na znaczne zmiany strukturalne, a w konsekwencji większe rozpraszanie energii i większe pełzanie, jak wspomniano wcześniej.

Wnioski

Metoda pętli histerezy może być z powodzeniem stosowana do oceny właściwości zmęczeniowych w odniesieniu do zjawiska pełzania dla poli(alifatyczno/aromatycznego-estru) (PED), będącego multiblokowym elastomerem termoplastycznym. Kopolimer PED wykazuje znacznie mniejsze pełzanie tj. mniejsze odkształcenie pod wpływem przyłożonego w warunkach dynamicznych obciążenia w porównaniu do kopolimeru poliuretanowego o porównywalnej twardości (Shore A 80).

BADANIA DZIAŁANIA CYTOTOKSYCZNEGO POROWATYCH IMPLANTÓW KORUNDOWYCH Z DODATKIEM ANTYBIOTYKÓW

DANUTA PALUCH*, STANISŁAW PIELKA*, LESZEK SOLSKI*,
JOANNA KARAS**, ZBIGNIEW JAEGERMANN**,
SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI**

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

** INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI W WARSZAWIE

[Inżynieria Biomateriałów, 37, (2004), 38-41]

Wstęp

Zakażenia kości trudno poddają się leczeniu i zazwyczaj wymagają długotrwałej kuracji antybiotykami. Miejscowe deponowanie odpowiednio skutecznego antybiotyku bezpośrednio do ogniska zakażenia zwiększa skuteczność leczenia i eliminuje skutki ogólnego, długotrwałego wpływu leku na cały organizm. Materiałem mogącym dobrze spełniać funkcję nośnika antybiotyku, szczególnie w chirurgii kości, są porowate implanty korundowe o wysokim stopniu biogodności. W Instytucie Szkła i Ceramiki w Warszawie opracowano porowate implanty korundowe w postaci pianki (45 ppi) z nośnikiem z hydroksypropylometylocelulozy HPMC firmy Fluka oraz porowate tworzywo korundowe z nośnikiem z poli(alkoholu winylu) PAW firmy Shin-Etsu. Z obu rodzajów materiałów przygotowano implanty z dodatkiem antybiotyków [1-4].

Piśmiennictwo

References

- [1] M. De Zee, F. Bojsen-Moller, M. Voigt, J. Appl. Physiol., 89 (2000) 1352-1359.
- [2] H.H. Kausch, Polymer Fracture, vol. 2 Polymer Properties and Applications. Springer Verlag, New York, 1978.
- [3] R.D. Jamison, K. Schulte, K.L. Reifsnider, W. W. Stinchcomb, ASTM STP 836, Philadelphia, PA (1984) 21-55.
- [4] M.J. Owen, Composite Materials, vol.5, Academic Press, New York, 1974.
- [5] M. El Fray, Prace Naukowe Politechniki Warszawskiej, 17, 2003, 1-144.
- [6] M. El Fray, V. Altstädt, Polymer, 2003, 44, 4635-4642.
- [7] M. El Fray, J. Slonecki, Angew. Macromol. Chem., 1996, 243, 103-109.
- [8] M. El Fray, A. Bartkowiak, P. Prowans, J. Slonecki J. Mater. Sci.- Mater. Med. 2000, 11, 757-762.
- [9] G. Gruenwald; Polymer Plastics How Structure Determines Properties, Hanser Publishers, Munich 1993. 221-234.
- [10] A. Takahara, K. Yamada, T. Kajiyama, M. Takayanagi, J. Biomed. Mater. Res., 1985, 19, 13-34.
- [11] A. Takahara, K. Yamada, T. Kajiyama, M. Takayanagi, W.J. Macknight, Polymer, 1985, 26, 987-996.

THE STUDY OF THE CYTOTOXICITY EFFECTS OF THE POROUS CORUNDUM IMPLANTS CONTAINING ANTIBIOTICS

DANUTA PALUCH*, STANISŁAW PIELKA*, LESZEK SOLSKI*,
JOANNA KARAS**, ZBIGNIEW JAEGERMANN**,
SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI**

*DEPARTMENT OF THE EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY OF WROCLAW

** INSTITUTE OF GLASS AND CERAMICS IN WARSAW

[Engineering of Biomaterials, 37, (2004), 38-41]

Introduction

The bone infections pose the significant clinical problem and in most cases they need a long antibiotics treatment. The effectiveness of the treatment could be increased by the local deposition of the antibiotics, what additionally decreased the general effect of the long lasting antibiotic treatment in human patients. Among the materials which could be used as the effective drug carriers, especially in bone surgery, are porous corundum implants of the high biocompatibility. At the Institute of Glass and Ceramics in Warsaw two different materials were worked out: the porous corundum in the form of foam (45 ppi) with the hydroxypropylomethyl-cellulose carrier (HPMC made by Fluka Co.) and porous corundum with the poly(vinyl alcohol) carrier (PAW made by Shin-Etsu). From these both materials the implants containing antibiotics were prepared. [1-3].

The main target of the study was the comparative as-

Celem badań była ocena porównawcza w warunkach *in vitro* porowatych tworzyw korundowych z dodatkiem antybiotyków nowej generacji.

Badania cytotoksyczności są szybkim, wystandaryzowanym, czułym testem dla określenia czy dany materiał zawiera znaczące ilości, biologicznie szkodliwych substancji. Wysoka czułość tych testów jest wynikiem izolacji kultur komórkowych, a zatem braku mechanizmów ochronnych, które towarzyszą komórkom wewnątrz ciała. Pozytywne wyniki badań cytotoksycznych mogą być wczesnym ostrzeżeniem, że badany materiał zawiera więcej toksycznych substancji aniżeli dopuszcza poziom kliniczny [5].

Materiał i metoda badań

Badaniu działania cytotoksycznego poddano następujące implanty:

1. Pianki korundowe z nośnikiem HPMC bez antybiotyku lub z dodatkiem następujących ilości antybiotyków: 27,5 mg ceftriaksonu (Biotrakson, firmy Bioton) lub 21,5 mg cyprofloksacyliny (firmy GZF Polfa Grodzisk Mazowiecki) lub 16 mg wankomycyny (Edicin, firmy Lek).
2. Porowate tworzywo korundowe z nośnikiem PAW bez antybiotyku lub z dodatkiem następujących ilości antybiotyków: 23,5 mg ceftriaksonu lub 26,5 mg cyprofloksacyliny lub 16,5 mg wankomycyny.

Wszystkie implanty przygotowane były przez próżniowe nasączenie nośnika korundowego odpowiednim nośnikiem polimerowym zawierającym w/w antybiotyki. Bezpośrednio po nasączeniu próbki zamrożono (temp. -18°C), a następnie wysuszono metodą liofilizacji.

Badania działania cytotoksycznego przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu na fibroblastach mysich 3T3 Balb/C założonych na płytkach Petriego w ilości 0,5 x 10⁶ każda. Każdy materiał oceniano na 9 hodowlach komórek (po 3 na każdy dzień badania). Hodowle komórkowe inkubowano w temperaturze 37°C z dodatkiem 5% CO₂. Zmiany ilościowe i morfologiczne w hodowlach komórkowych oceniono po 24, 48 i 72 h. Do oceny zastosowano barwienie czerwienią obojętną i błękitem trypanu. Wyniki ilościowe badań poddano analizie statystycznej.

Wyniki badań

Implanty korundowe bez antybiotyków

Po 24, 48 i 72 h w hodowlach po kontakcie z próbkami z pianki korundowej z nośnikiem HPMC i tworzywa korundowego z nośnikiem PAW komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. Nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji, oddzielenia od podłoża ani lizy błon komórkowych. Proliferacja komórek była prawidłowa i po 72 h komórki tworzyły kolonie. Ilość komórek żywych, po kontakcie z implantami w postaci pianki korundowej z HPMC, po 72 h była nieistotnie wyższa niż w hodowli macierzystej. Natomiast ilość komórek żywych, po kontakcie z porowatymi implantami korundowymi z PAW była nieistotnie niższa niż w hodowli macierzystej. Ilość komórek martwych po 72h, w przypadku pianki korundowej z HPMC wynosiła 2%, a w przypadku porowatego tworzywa korundowego z PAW - 3% całkowitej liczby fibroblastów, i była porównywalna z odsetkiem komórek martwych w hodowlach macierzystych -2% (RYS. 1, 2).

Implanty korundowe z dodatkiem ceftriaksonu

Po 24, 48 i 72 h w hodowli po kontakcie z próbkami z pianki korundowej z HPMC i tworzywa korundowego z nośnikiem PAW z dodatkiem ceftriaksonu komórki uległy silnemu obkurczeniu, aglutynacji i odklejeniu od podłoża. Pro-

assessment "in vitro" of the porous corundum implants with the new generation antibiotics added.

The evaluation of the cytotoxicity are quick, sensitive and standardized tests for the assessment of the biological impurities in the tested sample. The high sensitiveness of these tests is the result of isolation of cell culture, which as such have no defense mechanism which are present in the human body. The positive results of the cytotoxicity tests could be the early warning, that the material in question contains more toxic substances then this is allow at the clinical level [4].

Materials and methods

The study of cytotoxicity effects was carried on the following implant materials:

1. corundum foams with the HPMC carrier, without antibiotic or with the antibiotic of the following dosages: 27,5 mg cephtriaxon (Biotrakson, Bioton Co.) or 21,5 mg cyprofloxacin (GZF Polfa Co., Grodzisk Mazowiecki) or with 16 mg wankomycine (Edicin, Lek Co.);
2. porous corundum stuff with PAW carrier without antibiotic or with the antibiotics of the following dosages: 23,5 mg cephtriaxon (Biotrakson, Bioton Co.) or 26,5 mg cyprofloxacin (GZF Polfa Co., Grodzisk Mazowiecki) or with 16,5 mg wankomycine (Edicin, Lek Co.).

All implants were prepared by the vacuum soaking of the corundum materials with the proper polymer carrier with aforementioned antibiotics. Immediately after the materials have been soaked the samples were frozen at -18°C , and later all were dried by liophilisation.

Evaluation of the cytotoxicity was carried out by the method of direct contact on mouse fibroblast 3T3 Balb/C set up on Petri dishes at 0,5 x 10⁶ each. Each sample was evaluated on 9 cell cultures (3 each tested day). The cell cultures were incubated at $+37^{\circ}\text{C}$ with 5% CO₂ added. The quantity and morphological changes in the cell cultures were assessed after 24, 48 and 72 hours. For this purpose the dyed methods with neutral red and trypane blue were used. The quantitative results of these tests underwent the statistical analysis.

Results

Corundum implants without antibiotics

After 24, 48 and 72 hours in the cell cultures which had the contact with the samples of corundum foam with HPMC carrier and with the porous corundum stuff with PAW carrier (both without antibiotics) all cells were properly adhered to the bed and had proper morphological character. No agglutination, vacuolization, separation from the bed neither lysis of the cell's walls were observed. Proliferation of the cell was correct and yet after 72 hours the cells formed proper colonies. The quantity of the living cells after the contact with the implants in the form of corundum foam with HPMC carrier after 72 hours was higher then in the control cell culture but of no statistical importance. On the other hand the quantity of the living cells after contact with porous corundum implants was lower then in control culture, but as well of no statistical importance. Dead cell quantity after 72 hours of contact with corundum foam with HPMC was at the level of 2%, while in case of porous corundum with PAW at the level of 3% of the total number of fibroblasts and both was at the comparable level of dead cells counted for the control cultures -2% (FIG. 1, 2).

Corundum implants with cephtriaxon

After 24, 48 and 72 hours in the cell cultures which had

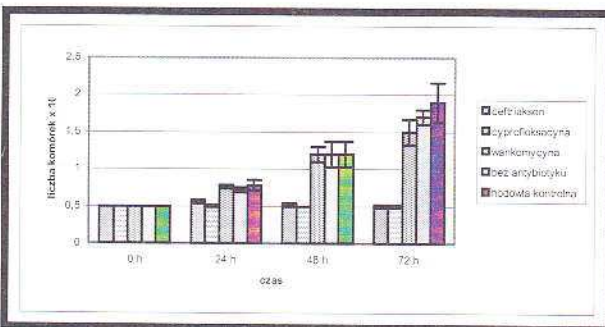
liferacja komórek w stosunku do wyjściowej liczby komórek była bardzo mała i wzrosła nieistotnie w porównaniu do wyjściowej liczby komórek. Liczba martwych komórek wyniosła 74% dla pianki korundowej z HPMC i 80% dla porowatego tworzywa korundowego z PAW. Po 48 h w hodowlach stwierdzono identyczne, jak po 24 h, zmiany morfologiczne komórek. Liczba martwych komórek wzrosła do 95% w przypadku pianki korundowej z HPMC i do 100% w przypadku porowatego tworzywa korundowego z PAW. Po 72 h odsetek komórek martwych wyniósł 100, a cała hodowla uległa zniszczeniu.

Implanty korundowe z dodatkiem cyprofloksacyny

Po 24 h w hodowli po kontakcie z próbkami z pianki korundowej z nośnikiem HPMC i tworzywa korundowego z nośnikiem PAW z dodatkiem cyprofloksacyny komórki uległy silnemu obkurczeniu i aglutynacji. Tylko niewielki procent komórek był przyklejony do podłoża. Stwierdzono 80% komórek martwych w przypadku pianki korundowej z HPMC i 90% w przypadku porowatego tworzywa korundowego z PAW. Proliferacja komórek w stosunku do wyjściowej liczby komórek była bardzo mała i wzrosła nieistotnie w porównaniu do wyjściowej liczby komórek. Po 48h liczba martwych komórek wzrosła do 90% w przypadku pianki korundowej z HPMC i do 100% w przypadku porowatego tworzywa korundowego z PAW. Po 72 h procent komórek martwych wyniósł 100, a hodowle uległy całkowitemu zniszczeniu. W każdym terminie badań, w polu widzenia, stwierdzono czarne masy, które świadczyły o wytrąceniu cyprofloksacyny.

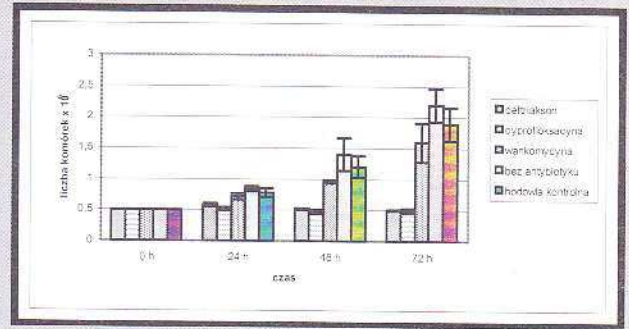
Implanty korundowe z dodatkiem 16 mg wankomycyny

Po 24, 48, 72h w hodowlach po kontakcie z próbkami z pianki korundowej z nośnikiem HPMC i tworzywa korundowego z nośnikiem PAW z dodatkiem wankomycyny, komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. Nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji, oddzielania od podłoża ani lizy błon komórkowych. We wszystkich hodowlach obserwowano dużą liczbę komórek w podziałach i ich prawidłową proliferację. Liczba komórek wzrosła istotnie w porównaniu do liczby wyjściowej oraz w porównaniu do prób z ceftriaksonem i cyprofloksacyną. Po 48 i 72 h w hodowlach stwierdzono nieistotnie wyższą liczbę komórek martwych w porównaniu do hodowli kontrolnej. We wszystkich hodowlach obserwowano pojedyncze powiększone komórki z ziarnistościami cytoplazmatycznymi. Po 24 h nie stwierdzono komórek martwych, a po 72 h



RYS. 2. Całkowita liczba fibroblastów mysich 3T3 Balb po kontakcie z implantami z porowatego tworzywa korundowego z nośnikiem PAW i z dodatkiem antybiotyków.

FIG. 2. The total number of mouse 3T3 Balb fibroblasts after the contact with porous corundum implants containing PAW and antibiotics.



RYS. 1. Całkowita liczba fibroblastów mysich 3T3 Balb po kontakcie z implantami w postaci pianki korundowej z nośnikiem HPMC i z dodatkiem antybiotyków.

FIG. 1. The total number of mouse 3T3 Balb fibroblasts after the contact with corundum foam implants containing HPMC and antibiotics.

the contact with the samples of corundum foam with HPMC carrier and with the porous corundum stuff with PAW carrier both with added cephtriaxon, cells were subject of the strong deformation and agglutination, and did not adhere to the bed. Cell's proliferation, as referred to the initial number, was very low and did not increase significantly. The quantity of dead cells was at the level of 74% for corundum foam with HPMC and even 80% for porous corundum with. After 48 hours the observed morphological changes of the cells were similar to those after 24h. The quantity of dead cells increased up to 95% and 100% for corundum foam with HPMC and porous corundum with PAW respectively. After 72 hours the in both cases all cells were dead (100%) and the cultures were destroyed.

Corundum implants with cyprophloxacin

After 24 hours in the cell cultures with the contact with samples of corundum foam with HPMC and porous corundum with PAW, both with cyprophloxacin, the cells were subject of the strong shrinking and agglutination. Only small quantity of the cells were still adhered to the bed. The 80% of the dead cells were noted in the case of contact with the corundum foam with HPMC and up to 90% in case of contact with porous corundum with PAW. Proliferation of the cells in relation to their initial quantity was very low and slightly increased. After 48h the quantity of dead cells were at the level of 90% and 100% for corundum foam with HPMC and porous corundum with PAW respectively. After 72 h in both cases all cells were dead in 100% and the cultures were destroyed. In all investigation times, in the microscopic field of views the black, amorphous masses were observed, being the precipitated cyprophloxacin.

Corundum implants with 16 mg of wankomycin

After 24, 48 and 72 hours in the cell cultures which had the contact with the samples of corundum foam with HPMC carrier and with the porous corundum stuff with PAW carrier both with added wankomycin, cells were of the proper morphological characteristic and all adhered to the bed. No agglutination, vacuolization, separation from the bed neither lysis of the cell's walls were observed. In all cultures the high number of the mitotic cells were observed what was the proof of their proper and fast proliferation. The quantity of the cells in the culture in contact with tested materials increased significantly as compared to their initial number and as compared to the culture in contact with other tested antibiotics, i.e. cephtriaxon and cyprophloxacin. After 48 and 72 hours in the cultures the higher number of dead cells were noted as compared to control culture but of no